

学 位 論 文 題 名

Molecular analysis of patient and carrier gene with congenital steroid 21-hydroxylase (CYP21B) deficiency by using polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism.

(ポリメラーゼ チェイン リアクション法並びにシングル ストランド
コンフォメーション ポリモルフィズム法を用いたステロイド21-
水酸化酵素欠損症患者における遺伝子解析と各変異の家系での遺伝形式の検討)

学位論文内容の要旨

(はじめに)

ステロイド21水酸化酵素欠損症は、先天性副腎過形成の中で約90%以上を占め、約15000人に1人の割合で発症し他の遺伝性疾患に比較すると発症頻度が高い。また常染色体劣性の遺伝形式をとり、新生児期に副腎不全を呈する場合もあることから、1989年より新生児マススクリーニングが実施されている。

ステロイド21水酸化酵素 (CYP21B) 遺伝子はその偽遺伝子である CYP21A 遺伝子と共に第6染色体短腕上の HLA クラス III 領域の中で、補体第4成分と隣接して存在している。このうちセントロメア側に存在する CYP21B 遺伝子のみが活性酵素のための情報を有して発現している。近年ステロイド21水酸化酵素欠損症患者における CYP21B 遺伝子の分子遺伝学的解析がなされ、本疾患はこの CYP21B 遺伝子の欠失、変換、点突然変異によって発症することが明らかにされ、その原因の約80%が点突然変異によると報告されている。

本疾患は多様性にとみ、その重症度の順に、塩類喪失型 (以下 SW)、単純男性型 (以下 SV)、遅発型 (以下 NC) の3型に分類されているが、遺伝子変異と病型との関係についての検討は少ない。

そこで本研究では、頻度の多い点突然変異を簡便に検出する方法を開発するとともに、北海道大学小児科でフォローしている患児の CYP21B 遺伝子異常の同定並びに病型との相関を明らかにすること、変異遺伝子の各家系内における遺伝形式についても検討することを目的とした。

(対象)

23人のステロイド21水酸化酵素欠損症患者 (SW 12名、SV 10名、NC 1名)ならびにそのなかで解析可能であった18家系の構成員よりゲノムDNAを抽出し、P450 CYP21B 遺伝子の解析を行なった。

(遺伝子解析)

簡便で迅速な点突然変異の検出法として Polymerase chain reaction (PCR)-Single strand conformation polymorphism {SSCP法(以下 PCR-SSCP法)} を検討した。PCR-SSCP法は放射能標識したプライマーまたはデオキシヌクレオチドを用いて PCR を行ない、PCR 産物を非変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動することによって、迅速にかつ正確に変異の検出を可能にする方法である。この PCR-SSCP法の結果は PCRダイレクトシーケンスに

よる結果と比較検討した。遺伝子の欠損の同定にはサザンハイブリダイゼーション法によった。

(結果)

- 1) Taq I と Bgl II の制限酵素を用いたサザンハイブリダイゼーションの結果1名に一对の遺伝子の欠失を認めた。また1名にB遺伝子のA遺伝子との部分的遺伝子変換を認めた。
- 2) PCR法によるダイレクトシーケンスの結果では1名を除き全員に点突然変異を認めた。さらにPCR法によるダイレクトシーケンスによって検出された変異はPCR-SSCP法にても同定できることを確認した。これらの点突然変異は総てA遺伝子に認められる4つの部分の点変異のいずれかであった。これらの中でmRNAのスプライシングの異常を引き起こす第2イントロンの変異がSW12名中4名に、SV10名中8名に認められた。アミノ酸の置換を伴う第4エクソンの変異は1名を除きSVならびにNCの患児に認められた。また第8エクソンの二つの変異はいずれもSWの患児に認められた。このことよりある程度変異と病型は関連している事が示唆された。
- 3) PCR-SSCP法を用いて18家系で各変異の遺伝形式を解析したが、大部分の家系では通常の常染色体劣性(AR)の遺伝形式を示したが、第2イントロンの変異で10家系中2家系、第8エクソンの終止コドンの変異で5家系中2家系、第4エクソンの変異で4家系中1家系の割合で各々 *de novo* の変異により本症を発症した家系が存在した。

(考案)

23人のステロイド21水酸化酵素欠損症患児の遺伝子変異の分布を検索したところ、1例を除き全例に遺伝子異常を認めた。その内訳は1例にのみ一对のCYP21B遺伝子の欠失を認め、他は点突然変異によるものであった。この結果は日本の他の報告と一致し遺伝子欠損の割合は諸外国に比して少ないことが示唆された。日本人において点突然変異の頻度が多いことから、正確かつ迅速に点突然変異を検出する方法の開発が必要である。PCR-SSCP法は今回の検討から簡便に点突然変異を診断可能とし非常に有用な方法であることが示唆された。又保因者の同定及び出生前診断に応用できると考えられた。今回検索した23名中18名に欠損または突然変異を二つの対立遺伝子に認めたが、4人の患者については一つの特異的遺伝子にのみ変異を認め、1人の患者には変異を同定できなかった。この変異を認めなかった症例に関しては5'上流または3'下流の調節領域の異常も考えられ検索中である。ところで藤井らは各変異の *in vitro* での酵素活性に及ぼす効果について検討し、酵素の失活の程度と症状の重症度が対応することを報告している。今回の検討でも、第4エクソンと第8エクソンの変異に関しては変異と病型は対応していた。しかし最も多く認められたmRNAのスプライシングの異常を起こす第2イントロンの変異はSWとSVの両病型に認められ、*in vitro* における酵素活性以外にも臨床症状に影響する要因の存在が示唆された。

PCR-SSCP法を用いて各変異について各々の家系での遺伝形式を検討したところ大部分の家系では通常の常染色体劣性遺伝の形式を示したが、第2イントロン、第4エクソン、第8エクソンの終止コドンの変異でそれぞれ2/10, 1/4, 2/5の割合で *de novo* の変異を認めた。これらの5家系のうち3家系では一方の保因者と同じ部位に変異が起こっていたが、2家系ではまったく新たに変異が起こっていた。これらの *de novo* の変異はすべて偽遺伝子であるA遺伝子に認められるものであり、B遺伝子とA遺伝子の間の組み換えによって起こったものと推測された。この *de novo* の変異の発症の機序については不明であるが、本症の発症頻度を高くしている理由の一つと思われた。またCYP21B遺伝子がHLAと連鎖しているため、HLAのタイピングが出生前診断、保因者の診断に利用されている。今回我々の検索した一家系でHLA、補体のタイプが同一にも関わらずSVとして発症した患児と本症を発症しなかった兄妹例を経験した。この家系では患児にのみ *de novo* の変異による第2イントロンの変異が存在し、この変異によって患児のみ発症していることが明らかになった。このことから *de novo* の変異の存在は本症の遺伝相談に注意が必要であり、出生前診断、保因者の診断に簡便なPCR-SSCP法による遺伝子診断が必要であることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 葛 巻 暹

学 位 論 文 題 名

Molecular analysis of patient and carrier gane with congenital steroid 21-hydroxylase (CYP21B) deficiency by using polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism.

(ポリメラーゼ チェイン リアクション法並びにシングル ストランド
コンフオーメーション ポリモルフィズム法を用いたステロイド21-
水酸化酵素欠損症患者における遺伝子解析と各変異の家系での遺伝形式の検討)

ステロイド21水酸化酵素欠損症は先天性副腎過形成の中で発症頻度が高くまた臨床的に多様性を示し、重症な順に塩類喪失型(SW)、単純男性型(SV)、遅発型(NC)の3型に分類されている。近年本疾患の原因が21水酸化酵素遺伝子の異常であることが明らかにされた。本研究は北大小児科でフォローしている23人のステロイド21水酸化酵素欠損症を対象に遺伝子異常と病型の多様性との相関、遺伝形式の検討及び簡便な遺伝子異常の検出法の開発を試みたものである。

遺伝子解析法は従来のサザンハイブリダイゼーションに加え、簡便で迅速な点突然変異の検出法としてpolymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism法(以下PCR-SSCP法)を用いて検討し、PCR-ダイレクトシーケンス法の結果と比較している。

遺伝子異常に関しては、23人中1名を除き、全員に異常を認めた。その内訳は1名に遺伝子欠失、1名に遺伝子変換を、さらにPCR-SSCP法を用いて点突然変異を検索し、20名に変異を検出し、それらはPCR-ダイレクトシーケンス法の結果と一致した。見い出された変異は全て偽遺伝子であるCYP21A遺伝子に認められるものであった。さらに各変異と病型との相関に関しては第2イントロンの変異がSWで4/12、SVで8/10と両病型に認められた。第4エクソンの変異は1名を除きSV、NCの患

児に認められた。また第8エクソンの変異はSWの患児にのみ認められた。この結果は各変異と病型との間にはある程度相関があること、逆に変異によって重症度を推定でき、速やかに適切な治療管理を可能とすることが示唆された。

PCR-SSCP法を用いて各家系において変異の遺伝形式を検討したところ、大部分は通常の常染色体劣性遺伝に従っていた。しかし各変異には*de novo*の変異により発症した家系が約20%存在した。HLAタイピングが本症の保因者、出生前診断によく利用されるが、今回分子遺伝学的に検討した1家系でHLAタイピングが全く同一にもかかわらず発症非発症の差を認めた姉弟例が経験された。この差異は第2イントロンの変異の*de novo*の変異によって説明可能であった。この結果は本症の遺伝相談に注意が必要であることを示唆する所見である。

以上、ステロイド21水酸化酵素欠損症の分子遺伝学的解析を行い変異と病型にはある程度相関があること、*de novo*の変異の存在は本疾患の遺伝相談に注意が必要であること、また本症の遺伝子診断を行う上でPCR-SSCP法は簡便かつ有用であることが明らかにされたことはこの研究の斬新かつユニークな点であり、学位論文として十分評価しうるものと考えた。副査の葛巻、小林両教授からはそれぞれの立場から数問の質問とさらに個別的にも審査を頂いたが、両教授とも合格と判定された。